

## 유전자 인공합성을 이용한 구제역 유전자 VP1의 제작과 *Agrobacterium* Vector System을 이용한 담배 형질전환

이은정<sup>1</sup>, 임희영<sup>1</sup>, 김성훈<sup>2</sup>, 강경선<sup>3</sup>, 박영두<sup>4</sup>, 윤충효<sup>5\*</sup>, 윤병수<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>경기대학교 자연과학부 생물학과, <sup>2</sup>경희대학교 동서의학 대학원, <sup>3</sup>서울대학교 수의대,  
<sup>4</sup>경희대학교 생명과학부, <sup>5</sup>농촌진흥청 농업생명공학연구원

### Construction of FMDV VP1 Gene Using Artificial DNA Synthesis and Transformation of *Nicotiana tabacum* Using *Agrobacterium* Vector System

Eun-Jung Lee<sup>1</sup>, Hee-Young Lim<sup>1</sup>, Sung Hoon Kim<sup>2</sup>, Kyung Sun Kang<sup>3</sup>,  
Young Doo Park<sup>4</sup>, Choong Hyo Yun<sup>5\*</sup>, Byoung Su Yoon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Division of Natural Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

<sup>2</sup>Graduate School of East-West Medical Science, Kyonghee University, Suwon 449-701, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>4</sup>College of Life Science, Kyonghee University, Suwon 449-701, Korea

<sup>5</sup>National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT** FMDV is a viral pathogen that caused foot-and-mouth disease in animals. VP1 is a major capsid protein of FMDV. It is known as one of best materials for the FMDV diagnosis and for the development of protein vaccine. In this study, 633 bp of VP1 gene was modified for the expression of VP1 in plant, based on the VP1 DNA sequence from FMDV taiwan O type and from FMDV isolated vietnam. The deduced DNA fragment was artificially synthesized using the multiple fragment extension with long-nucleotides. A new plant transgenic vector system, pCAMBIA1390II was constructed on the basis of pBI121 and pCAMBIA1390. Using this vector system and GFP gene or modified VP1 gene, each target gene was introduced into *Nicotiana tabacum*. The insertion of whole target gene was successfully confirmed in each transgenic plant named GFP-A7 and VP1-4, respectively. The expression level of each gene was estimated by RT-PCR and Real-Time PCR using VP1, GFP specific primers.

**Key words:** FMDV, plant transgenic vector system, synthetic gene, VP1 gene

#### 서 론

구제역 (foot and mouth disease; FMD)은 소형의 단상 RNA 바이러스인 구제역바이러스 (FMDV)에 의하여 전염

되는 1급 가축 전염병으로, 공기에 의해 전염되고, 특이적으로 우제류에만 감염되며, 복미를 제외한 세계 전역에 끊임없이 발병되어 막대한 피해를 입히고 있다 (Gareth 2002; Alexandersen et al. 2003; Samuel and Knowles 2003). 우리나라의 경우, 1934년 이래 발병사례가 없어 구제역 청정국으로 분류되어 왔으나, 2000년 3월 24일 SKR-O형으로 명명된 한국형 FMDV에 의한 구제역이 새로이 발생 되었으며,

\*Corresponding author Tel 031-299-1691 Fax 031-299-1672  
Tel 031-249-9645 Fax 031-243-1707  
E-mail chyun5311@rda.go.kr, bsyoon@kyonggi.ac.kr

구제역 확산을 막기 위한 FMDV 예방백신의 접종을 시행하였기에, 이 조치로 인하여 국제수역사무국 (OIE)에 의해 구제역 청정지역에서 한국은 제외되게 되었다.

구제역바이러스 (FMDV)는 현재 다양한 유전체의 염기서열이 알려져 있으나, 일반적으로 약 7 kb 크기의 유전체에 다수 단백질의 유전정보가 연결되어 있는 polyprotein 유전자의 형태로 되어 있다 (Grubman et al. 2003). 대만에서 발생한 FMDV strain Chu-Pei의 유전체는 크기가 7,733 염기이며, 1개의 polyprotein 유전자를 가지고 있으며, 이는 발현 후 capsid protein인 VP1, VP2, VP3와 VP4, genome linked protein인 VPg1, VPg2, VPg3와 3A protein, 3개의 protease, RNA 중합효소의 유전자 등 총 12개의 단백질로 나누어진다 (Feng et al. 2003). 이들 중 VP1 단백질은 capsid protein 중 가장 바깥에 위치해 있는 주요 단백질이라는 이유로 구제역의 진단법 개발 및 구제역에 대한 단백질 백신의 연구에서 우선적으로 선택되어 왔다 (Wigdorovitz 1999; Wu et al. 2003).

일반적으로 사용되고 있는 구제역 예방백신은 약독화 또는 불활화된 바이러스를 사용하여 왔으나, 백신의 제조에서 포함될 수 있는 소수의 활화 FMDV에 의하여 질병의 신규 발생이 가능하고, 또한 발병된 가축과 예방접종된 가축간의 구분이 어렵다는 큰 문제점이 있다. 이에 비하여 FMDV의 고유 단백질만을 대장균이나 효모에서 생산하여 FMD에 대한 면역원으로 사용하고자 하는 protein vaccine (subunit 또는 peptide vaccine)의 방법은 아직 방어면역 유도의 능력 면에서 전통적 백신에 비하여 미흡한 것으로 평가되고 있으나, 면역원의 생산성, edible vaccine으로의 사용 가능성 및 면역유도 능력의 향상 가능성 등의 이유로 그 발전이 주목되고 있다 (Fisher and Emans 2004).

따라서, 본 연구는 구제역 바이러스의 구조 단백질인 VP1 단백질을 식물체에서 생산함으로써, 종전까지 숙주로 사용하고 있는 대장균 또는 효모에서 보다 생산성 및 유용성을 증가시키며, 백신개발에 있어 재료의 안전성을 높이고 또한 edible vaccine으로의 가능성을 타진해 보고자 시도되었다. VP1의 고유단백질을 생산할 유전자를, 대만에서 발생한 FMDV Taiwan O type (GenBank accession no. AF308157) 및 베트남 현지에서 확보한 strain Vietnam의 VP1 염기서열 등을 기초로 하여, 다양한 FMDV strain들에 대한 적용 가능성을 높이기 위하여 재편집을 수행하였고, 담배의 codon usage도 고려하여 인공적으로 합성하였다. 또한, 발현을 보다 강화시키기 위하여 CaMV 35S promotor를 가지고, 식물체의 신속한 선별을 위해, hygromycin을 selection marker로 사용하는 새로운 식물형질전환용 벡터를 제작하여 사용하였다.

## 재료 및 방법

### VP1 유전자의 DNA 인공합성 및 GFP gene 증폭

본 연구에 사용된 VP1 유전자의 염기서열은 FMDV Taiwan O type의 VP1 유전자 및 strain Vietnam의 VP1 염기서열을 기본으로 편집한 것이며, 식물의 codon usage도 고려하여 재편집하여 설계하였다. 설계된 VP1 유전자는 시작코돈과 종결코돈을 제외한 VP1의 전체 염기서열을 포함하는 것이며, 이는 유전자 인공합성 방법을 통해 DNA로 확보하였다. 일반적으로 유전자 인공합성은 유전자 자원을 구하기 힘든 강력한 병원균 등의 유전자를 안전한 방법으로 확보할 수 있는 방법으로 사용하나, 본 연구에서는 담배의 codon usage를 고려한 새로운 sequence의 유전자를 확보하기 위해 이 방법을 사용하였다.

유전자 인공합성의 방법을 약술하면, 합성하려는 유전자를 10개 부위로 나누어, 인접 부위 간 합성반응에 적합한 중복부위를 포함하게 long-nucleotide (80-90mers)를 설계하고 (Table 1), 제작된 long-nucleotide (Bionics Co., Korea)들 중 가장 중심 위치에 있는 long-nucleotide들 (VP1-1F, VP1-1R)을 먼저 templateless nucleotide extension의 방법으로 core fragment를 합성하고, 합성된 core fragment는 extension-PCR (core fragment를 template로 하여, 인접한 long-nucleotide를 이용한 extension)의 방법으로 2차 extended fragment를 제작하였으며, 이를 다시 template로 하여 같은 방법으로 3차, 4차 및 5차 extension을 수행함으로써 최종 633 bp의 DNA fragment를 제작하였다. 유전자 양끝 부위의 염기서열을 이용한 specific PCR로 이 DNA fragment를 증폭시켰으며, 클론화, 염기서열분석 및 돌연변이체의 수정을 통하여 VP1 유전자 633 bp의 DNA의 인공합성을 완료하였다 (Figure 1).

또한 이 VP1 유전자가 형질전환 vector인 pBI121에 쉽게 삽입, 발현될 수 있도록, 개시코돈 상류의 18 염기를 그대로 포함하는 oligonucleotide를 제작하여 (VP1F-BamHI, VP1R-SacI) PCR을 수행함으로써 변형된 VP1의 PCR product를 만들었으며, 이를 T-vector인 pBX에 클론화하여 pBX-VP1, pBX-GFP plasmid DNA를 제작하였다. PCR 조성은 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 pmol primers, 2.5 mM dNTPs 그리고 1× PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100)의 혼합액 98 μl를 첨가하고 94°C에서 3 분 동안 denaturation을 하고, 5 unit의 Taq polymerase (GeneClone Co., Korea)를 첨가한 후, 94°C 30 초, 63°C 30 초, 72°C 1 분을 30 회 수행하고, 마지막으로 72°C에서 5 분간 final elongation을 주어 증폭하였다. 모든 PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, U.S.A.)을 사용하였으며, 형질전환 vector인 pBI121에 삽입하기 위한 VP1 유전자의 길이는 총 660 bp가 되었다. 녹색형광 단백질

**Table 1.** Oligonucleotide sequences of *VP1* gene for DNA artificial synthesis.

Primer name	Primer sequence
<i>VP1</i> -1F	5'-CCGTCAAGCACGAGGGCGATCTCACCTGGGTCCCAAACGGCGCCCC TGAGACAGCACTGGACAACACTACCAACCCAACAGCTTACCACA-3'
<i>VP1</i> -2F	5'-ATCCCTGCCCACACCTTGGTAGGGGCGCTCCTGCGAACGGCCACCT ACTACTTCTCTGACCTGGAGCTGGCCGTCAAGCACGAGGGCGAT-3'
<i>VP1</i> -3F	5'-TGCGTTCATACTGGACAGGTTTCGTGAAAGTCAAGCCAAAAGGAACAA GTTAATGTGTTGGACCTGATGCAGATCCCTGCCCACACCTTGGT-3'
<i>VP1</i> -4F	5'-ACCCCGTGACTIONGACCACCGTCGAGAACTACGGTGGTGAGACACAAGT CCAGAGGGCCAGCACACGGACATTGCGTTCATACTGGACAGGT-3'
<i>VP1</i> -5F	5'-ACCACCTCTGCGGGTGAGTCTGCGGACCCCGTGACTGCCACCGTC-3'
<i>VP1</i> -1R	5'-CCGTTGTAGACGGTTCGTAAGACACGGTGTGGAGCCGTGTAAGGCA GCGCCAGCCGTGTGAGGGGTTCTTGTGGTAAGCTGTTGGGTTG-3'
<i>VP1</i> -2R	5'-TGCCTTCTGAGCTAACACTTGAAGGTCACCTCTCACGTTGTTAGTG CTGGTGTACCCGACTTACTGCTCCCGTTGTAGACGGTCGCTAA-3'
<i>VP1</i> -3R	5'-TGTAGAGTAGTTCAGTAACACGAGTTGCCTTGATGGCACCGAAGTT GAAGGAGGTAGGCAGAGTCTTTCTGCCTTCTGAGCTAACACTT-3'
<i>VP1</i> -4R	5'-TTGTGTCTAGCGTCACTCGGTTGAATGGCGAGAAGGGCCTGGGAC AGTATGTCTCGGCTCTCTTCATTC TGTAGAGTAG TTCAGTAACA-3'
<i>VP1</i> -5R	5'-CTGTTTTGCGGGTGCCACAATCCTCTGCTTGTGTCTAGCGTCACTCGG-3'
<i>GFP</i> - forward- <i>Bam</i> HI	5'-GGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGAGTAAAGGAGAAGAA-3'
<i>GFP</i> - reverse- <i>Sac</i> I	5'-GAGCT CTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTC-3'
<i>VP1</i> - forward- <i>Bam</i> HI	5'-GGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGACCACCTCTGCGGGT-3'
<i>VP1</i> - reverse- <i>Sac</i> I	5'-GA GCTCCTGTTTTGCGGGTGCCACAATCCTCT-3'

```

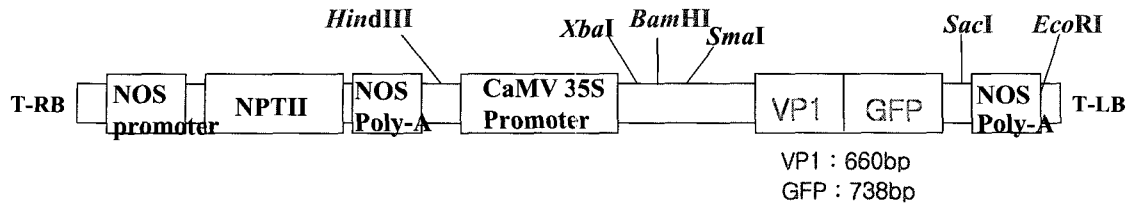
5'- ACCACCTCTGCGGGTGAGTCTGCGGACCCCGTGACTGCCACCGTCGAGAACTACGGT      57
   T T S A G E S A D P V T A T V E N Y G      19
GGTGAGACACAAGTCCAGAGGGCCAGCACACGGACATTGCGTTCATACTGGACAGGTTG      117
G E T Q V Q R R Q H T D I A F I L D R F      39
GTGAAAGTCAAGCCAAAGGAACAAGTTAATGTGTTGGACCTGATGCAGATCCCTGCCCAC      177
V K V K P K E Q V N V L D L M Q I P A H      59
ACCTTGGTAGGGGCGCTCCTGCGAACGGCCACCTACTACTTCTCTGACCTGGAGCTGGCC      237
T L V G A L L R T A T Y Y F S D L E L A      79
GTCAAGCACGAGGGCGATCTCACCTGGGTCCCAAACGGCGCCCCTGAGACAGCACTGGAC      297
V K H E G D L T W V P N G A P E T A L D      99
AACACTACCAACCCAACAGCTTACCACAAGGAACCCCTCACACGGCTGGCGCTGCCTTAC      357
N T T N P T A Y H K E P L T R L A L P Y      119
ACGGCTCCACACCGTGTCTTAGCGACCGTCTACAACGGGAGCAGTAAGTACGGTGACACC      417
T A P H R V L A T V Y N G S S K Y G D T      139
AGCACTAACAAACGTGAGAGGTGACCTTCAAGTGTTAGCTCAGAAGGCAGAAAGAACTCTG      477
S T N N V R G D L Q V L A Q K A E R T L      159
CCTACCTCCTTCAACTTCGGTGCCATCAAGGCAACTCGTGTACTGAACTACTCTACAGA      537
P T S F N F G A I K A T R V T E L L Y R      179
ATGAAGAGAGCCGAGACATACTGTCCCAGGCCCTTCTCGCCATTCAACCGAGTGACGCT      597
M K R A E T Y C P R P L L A I Q P S D A      199
AGACACAAGCAGAGGATTGTGGCACCCGCAAAACAG -3'      633
R H K Q R I V A P A K Q      211
    
```

**Figure 1.** DNA sequence of artificially synthesized *VP1* gene.

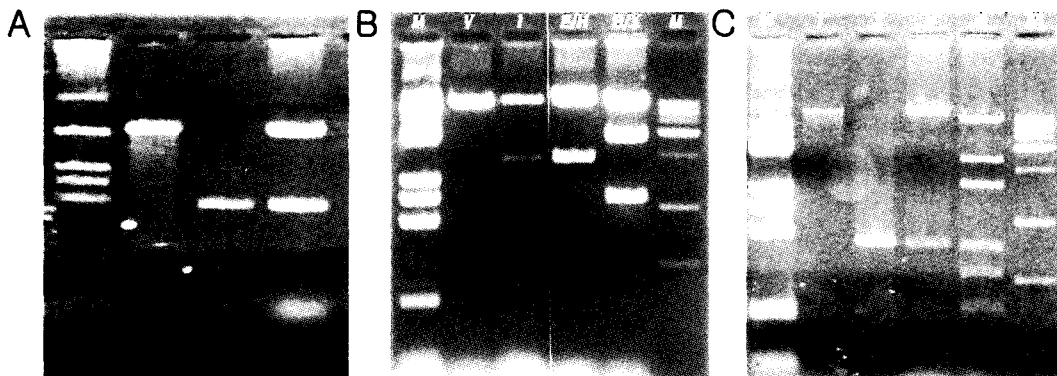
(Green fluorescent protein, *GFP*) 유전자 (Chen 2003; Newell 2003; Reisen 2003)를 증폭하기 위하여는 pQE-*GFP* plasmid DNA를 주형으로 사용하였으며, 상기의 방법으로 PCR, 클론 화 및 염기서열 분석을 수행하였다 (Table 1).

식물 형질전환용 vector의 구축

식물형질전환용 벡터인 pBI121은 식물체 내에서 과발현을 유도하는 CaMV 35S promoter를 가지고 있으며, kanamycin

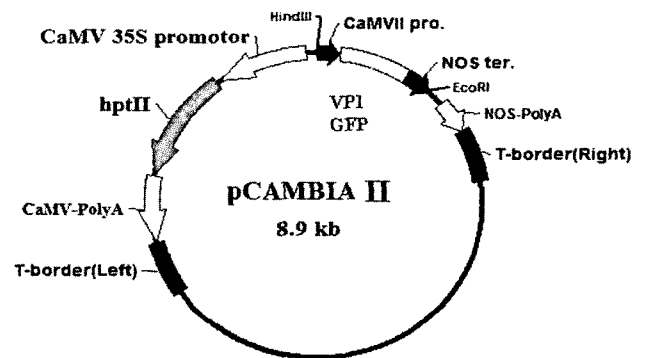


**Figure 2.** A Schematic diagram of the plant expression vector, pBI121-*GFP*, *VP1*, for the transformation of *Nicotiana tabacum*. pBI121 vector has CaMV 35S promoter, which is able to enhance the expression of target gene in transgenic plant. All genes including *Bam*HI and *Sac*I site could be used for the transformation of plants using the present vector. LB, left border; RB, right border; CaMV 35S, 35S cauliflower mosaic virus promoter; NOS poly-A, the terminator of nopaline synthase gene; NPTII, neomycin phosphotransferase II (kanamycin resistance).



**Figure 3.** Restriction analysis of recombinant pBX-*VP1* or -*GFP* clones, recombinant pBI-*VP1* or -*GFP* clones, recombinant pCAMBIA II-*VP1*, -*GFP* clones. Synthesized *VP1* or *GFP* gene was cloned in TA cloning vector, pBX. pBI121-*VP1* or -*GFP* was constructed by exchanging of *VP1* or *GFP* gene with *Bam*HI, *Sac*I site in pBI121. pCAMBIA II-*VP1* or -*GFP* was achieved by insertion of CaMV 35S promoter cassette of pBI121 vector to *Hind*III and *Eco*RI site in pCAMBIA 1390 vector. A: Lane 1, pBX (*Xcm*I)-vector (2.9 kb); Lane 2, *GFP* PCR product; Lane 3, pBX-*GFP* clone (B/S). B: Lane 1, pBI121 (B/S); Lane 2, pBX-*GFP* clone (B/S); Lane 3, pBI-*GFP* clone (B/S); Lane 4, pBI-*GFP* clone (*Nco*I, *Hind*III) - 327, 528, 710, 1552, 2276, 8211 bp. C: Lane 1, pCAMBIA 1390 (H/E); Lane 2, pBI-*GFP* (H/E); Lane3, pCAM-*GFP* (H/E); Lane 4, pCAM-*GFP* (*Bgl*II/*Xba*I) - 1.1 kb, 2.7 kb, 7 kb.

저항성 유전자를 가지고 있다. 그러나 kanamycin 저항성 유전자는 대장균 및 식물의 형질전환체를 선별하는 데 있어 hygromycin에 비하여 유용하지 않기 때문에, 형질전환체의 선별을 보다 신속하고 정확하게 하기 위하여 hygromycin 저항성 유전자 및 CaMV 35S promoter를 갖는 새로운 식물 형질전환용 벡터를 제작하였다. 먼저, pBI121 벡터에 5' 말단의 *Bam*HI, 3' 말단의 *Sac*I 제한효소로 수식된 각 *VP1* 유전자 및 *GFP* 유전자를 삽입하였고, CaMV 35S promoter와 NOS poly terminator를 포함하는 식물 형질전환용 벡터를 제작하였으며, 이를 pBI-*VP1*, pBI-*GFP* 라 명명하였다 (Figure 2). Hygromycin 저항성 유전자를 이용하기 위해서 pCAMBIA1390 벡터에 제한효소 *Hind*III, *Eco*RI를 사용하여 유전자 재조합을 수행하였고, 이를 각각 pCAMBIA II-*VP1*, pCAMBIA II-*GFP* 라 명명하였다 (Figure 3, 4). 이 식물 형질전환용 벡터는 5' 말단의 *Bam*HI, 3' 말단의 *Sac*I 제한효소로 수식된 어떠한 새로운 유전자도 손쉽게 유전자의 재조합이 가능하게 하였다. 또한, CaMV 35S promoter와 NOS poly terminator를 포함하며, hygromycin 저항성 유전자를 가지는 식물 형질전환용 벡터를 완성하였다. 본 연구에서는



**Figure 4.** Genetic map of a new *Agrobacterium* vector system, pCAMBIA 1390 II, for plant transformation. pCAMBIA II vector contains CaMV 35S promoter for strong induction and hygromycin resistance for selection of transformants. Insertion of any target gene is available at the same site of *Bam*HI and *Sac*I around *VP1* or *GFP*. LB, left border; RB, right border; CaMV 35S, 35S cauliflower mosaic virus promoter; CaMV-poly, the terminator of CaMV; NOS poly-A, the terminator of nopaline synthase gene; hptII, hygromycin phosphotransferase.

pCAMBIA II-*VP1*, pCAMBIA II-*GFP* plasmid DNA를 실험에 사용하였다.

### VP1 및 GFP 유전자의 담배 형질전환 및 캘러스의 형성

제작된 형질전환용 clone은 freeze and thaw method (Hooykaas 1989)를 사용하여 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 형질전환 후, 담배의 형질전환에 사용하였다 (Endo et al. 2001). 이를 약술하면, 담배 (*Nicotiana tabacum*, SR1) 자엽절편은 생장실에서 무균 배양하여 생육시킨 담배의 건전한 자엽을 사용하였으며, 이를 실험에 적당한 크기 (약 1.0 cm<sup>2</sup>)로 절단하고, pCAMBIA II-VP1 또는 pCAMBIA II-GFP가 형질전환된 *Agrobacterium*의 배양액에 침전시켜 감염을 수행하였다. *Agrobacterium*은 28°C YEP 배지에서 48 시간 배양하여 안정화시켰으며, 이를 다시 28°C에서 24시간 계대 배양한 배양액을 감염에 사용하였다. 세균과 식물체의 접촉시간은 2분으로 하였다. 감염 후, 식물체는 무균 filter paper에서 약 5분간 건조하였고, 22°C에서 암배양 3 일 후 (MS배지, BA 1.5 mg/L, sucrose 3%, agar 0.8%), 항생제 (hygromycin 5 mg/L, cefotaxime 200 mg/L)가 첨가된 재분화 배지에 옮겼다 (Murashige and Skoog 1962; Ohira 1973; Ikeda 1976). Hygromycin 내성을 갖는 캘러스로부터 발생한 싹을 뿌리유도 배지(Zatyko 1990)에 치상하여 순화시킨 후, 분석 시료로 사용하였다.

### 형질전환체의 genomic DNA 분석

형질전환된 개체로부터 insert DNA의 삽입여부를 판별하기 위해, genomic DNA를 분리하였다. 캘러스 100-200 mg의 시료에서 chromosomal DNA를 분리하였으며 (Bio-solution Co., genomic DNA extraction kit), 선발배지를 통해 성장한 형질전환체 내에 GFP 및 VP1 유전자가 존재하는지 여부를 확인하기 위해 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR의 반응액 조성은 전체 반응액은 100 µl로 하였고, 10 ng template DNA, 각 100 pmol primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 2.5 U *Taq* polymerase로 구성되었다. GFP와 VP1 유전자의 삽입 여부를 각각 확인하기 위하여, 유전자 증폭을 위해 사용했던 동일한 primer를 사용하였다. 사용된 primer는 GFP- forward- BamHI 5'-GGATCCCCG GGTGGTCAGTCCCTTATGAGTAAAGGAGAAGAA-3', GFP- reverse- SacI 5'-GAGCTCTTTGTATAGTTCATCCAT GCCATGTC-3', VP1- forward-BamHI 5'-GGATCCCCGG GTGGTCAGTCCCTTATGACCACCTCTGCGGGT-3', VP1-reverse-SacI (5'-GAGCTCCTGTTTTGCGGGTGCCA CAATCCTCT-3')이며, PCR 조건은 GFP의 경우 94°C에서 3분간 변성 후 denaturation은 94°C에서 30 초, annealing은 58°C에서 30 초, extension은 72°C에서 30 초로 하여 30 회 수행하고 충분한 PCR 산물을 얻기 위해 마지막에 72°C에서 5 분간 extension을 수행하였다. VP1 유전자의 검출을 위한 PCR 조건은 나머지 조건은 동일하게 하고, annealing은 63°C

에서 30 초로 하였다. PCR 수행 후 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 대조군으로, 대장균에 있는 VP1과 GFP 유전자를 갖고 있는 plasmid DNA를 동일한 primer를 사용해 동시에 PCR을 수행하여 전체길이가 삽입된 PCR product band를 확인하였으며, 각기 적절한 제한효소 절단으로 올바른 PCR product가 형성되었음을 재 확인하였다.

### 형질전환 담배의 total RNA isolation, RT-PCR 및 Real-Time RT-PCR 분석

형질전환된 식물체에서 유전자의 발현여부를 확인하기 위해, 형질전환된 담배의 callus 또는 잎과 형질전환시키지 않은 담배 (SR1)의 callus 또는 잎으로부터 total RNA를 추출하였다 (Yoon 1999). 이를 간단히 기술하면; 액체질소와 막자사발을 사용하여 0.5 g callus 또는 잎을 분쇄한 후, 1 ml Trizol reagent (Invitrogen, Cat. No. 15596-026)를 넣고, homogenizer를 이용하여 재차 분쇄하였다. 분쇄한 조직들을 1.5 ml microtube에 넣고, 상온에서 5분간 정치한 뒤 250 µl의 chloroform /isoamylalcohol (24/1)을 넣고 15초간 vortex mixing, 15초간 정치를 15분간 반복하였다. 이 용액을 12,000g (11,000rpm), 4°C, 15분간 원심분리 후 상등액 400~600 µl를 채취하여 새로운 microtube에 옮겼다. 채취한 상등액과 동량의 isopropanol을 넣고 상온에서 10분 정치하였고, 이를 15분간 원심분리하여 상등액을 완전히 제거하였고, 1 mL의 75% ethanol을 넣고 세척 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 상온에서 20분 건조시킨 후, 여기에 증류수를 40 µl 넣어 완전히 녹인 다음, 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 추출한 RNA의 농도와 순수도를 측정하였다.

추출한 RNA를 이용한 reverse transcription (RT)은 다음의 조성으로 하였다. 각 2 µg의 total RNA를 사용하였으며, 1 × RT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 30 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 150 unit reverse transcriptase (MMLV), 50 pmole VP1- 또는 GFP-reverse primer, 4 unit RNase inhibitor, 2.5 mM dNTP 를 첨가하고, 45°C, 45분의 RT-reaction에 이어 99°C, 5분으로 불활화하였다. 총 반응액의 양은 20 µl 으로, GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, U.S.A.)을 사용하여 수행하였다. 1차 PCR은 total volume 100 µl으로 10 ng template DNA, 각 50 pmol VP1- 또는 GFP-forward 및 reverse primer pairs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 2.5 U *Taq* polymerase로 조성하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성 후 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 63°C에서 1분, extension은 72°C에서 30초로 하여 35 회 수행하였고 충분한 PCR 산물을 얻기 위해 마지막에 72°C에서 5분간 extension을 수행하였다. 한편 RT-PCR 및 Real-Time PCR에 의한 정량을 위하여, RT-reaction의 조성에서 동량의 시료를 사용한 2 종류의 반응액, 즉 정상 RT-reaction과 reverse transcriptase만을 제

위한 RT-reaction을 조성하였고, 항상 같은 조건으로 반응을 수행하였다.

Real-Time RT-PCR은 역시 합성된 1  $\mu$ l cDNA (정상 RT-reaction 또는 reverse transcriptase만을 제외한 RT-reaction)를 template로 사용하였고, 총 volume은 20  $\mu$ l로, primer는 RT-PCR과 동일한 *VP1-forward* 및 *VP1-reverse*를 각 10 pmole의 농도로 사용하였다. 형광시약은 2x SYBR Green supermix (Bio-Rad)를 사용하였으며, Bio-Rad사의 Real-Time MY-IQ machine을 사용하였다. PCR의 조건은 94°C에서 5분간 변성 후 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 63°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초로 하여 35 회 수행하였고, Real-Time PCR의 조건은 excitation은 490nm, emission은 530nm, exposure time은 500 msec, 필터 당 측정시간은 3초로 하였으며,  $C_T$  (Threshold cycle) value는 3-12 cycle에서 보여준 형광강도의 표준편차에 10 배에 해당되는 형광강도를 나타내는 cycle로 결정하였다. 또한 PCR과정의 종료 후 melting point analysis는 55°C에서 시작하여 10초당 0.5°C씩 94°C까지 올리며 진행하였으며, 이로써 생성된 PCR product의 순수도를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### VP1 인공유전자의 제작

*VP1* 인공유전자는 80-90 bp 크기로 제작한 long-nucleotide를 PCR을 통해 연결시키는 방법으로 DNA를 인공합성하였다. 주형 없이 각각의 oligonucleotide를 여러 횟수의 PCR을 통해 유전자의 길이를 증폭시켰고, 이렇게 제작된 유전자는 T-vector에 cloning하여 확보하였으며, sequencing을 통해 염기서열을 확인하였다 (Figure 1). 합성된 총 *VP1* DNA의 길이는 633 bp이며, 211개의 아미노산을 암호화하고 있다. 이 *VP1* 유전자는 형질전환시 사용된 pBI121 vector의 개시코돈을 그대로 사용하고자 pBI121에서 유전자의 발현이 시작되는 개시코돈까지의 거리, 18 mer를 포함하여 *VP1* 유전자를 편집할 때, start codon을 제외하였고, pBI121 vector에는 NOS poly A가 존재하므로 종결코돈 또한 제외시켰다. 이로써 변형된 *VP1* DNA의 길이는 사용한 primer의 서열을 포함하여 총 660 bp가 되었다.

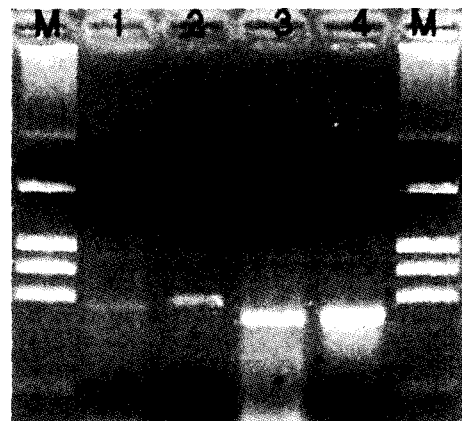
### VP1, GFP 유전자의 식물체 형질전환용 벡터 제작

*VP1* 유전자는 660 bp의 크기로, 5' 말단에 *Bam*HI, 3' 말단에 *Sac*I enzyme site를 포함하게 하였다. 또한 *Bam*HI부터 *VP1* 또는 *GFP* 유전자의 개시코돈간은 각각 18, 24 mer의 염기를 포함하도록 제작하였다. 이는 식물체 내에서 삽입시킨 유전자를 효과적으로 발현시키기 위한 것으로, pBI121

vector의 CaMV 35S promotor와 GUS의 시작코돈간의 거리와 일치시킨 것이다. 따라서 인공합성된 633 bp의 *VP1* 유전자는 *VP1-forward-Bam*HI (5'-GGATCCCCGGGTG GTCAGTCCCTTATGACCACCTCTGCGGGT-3'), *VP1-reverse-Sac*I (5'-GAGCTCCTGTTTTGCGGGTGCCA CAATCCTCT-3')의 primer로 증폭되었으며, 이로써 pBI121-*VP1*을 거쳐 pCAMBIA II-*VP1*을 완성하였다. *GFP*의 경우, 특이적 primer를 사용하여 제작된 *GFP* PCR product를 주형으로 하여, 재차 *GFP-forward-Bam*HI (5'-GGATCC CCGGGTGGTTCAGTCCCTTATGAGTAAAGGAGAAGA A-3'), *GFP-reverse-Sac*I (5'-GAGCTCTTTGTATAGTTC ATCCATGCCATGTC-3')을 사용한 특이적 PCR로 DNA fragment를 얻었으며, T-vector cloning 및 염기서열 확인 후 (738 bp), pBI121-*GFP*를 거쳐 pCAMBIA II-*GFP*를 완성하였다 (Figure 4). 본 연구를 통하여 새로이 제작된 범용 식물형질전환용 pCAMBIA II vector는 target gene의 삽입을 위한 유전자 재조합에서 5' 말단에 *Bam*HI, 3' 말단에 *Sac*I의 제한 효소를 사용하여 간단히 치환되게 하였으며, 이를 위한 대장균에서의 선별은 kanamycin을 사용하고, 형질전환된 식물체에서의 선별은 T-border 내부에 존재하는 hygromycin 저항성을 이용하게 하였다. 또한 본래 존재하는 유전자와 치환된 target gene은 CaMV 35S promoter로 발현이 조절되게 하였다.

### VP1, GFP 유전자가 도입된 담배 형질전환체의 선별

pCAMBIA II-*VP1*, pCAMBIA II-*GFP*가 형질전환된 *Agrobacterium*을 leaf disk transformation 방법에 의해 담



**Figure 5.** PCR detection of *VP1* or *GFP* gene in *Nicotiana tabacum*. Insertion of *VP1*, *GFP* gene was recognized by specific PCR, respectively. Specific PCR was performed using genomic DNA isolated from transgenic or non-transgenic plant of *Nicotiana tabacum*. PCR product of *VP1* (660 bp) or *GFP* (738 bp) was detected only in transgenic plant. Lane M, PS44 (*Bam*HI, *Hind*III); Lane 1, *GFP* callus PCR product (738 bp); Lane 2, *GFP* PCR product in *E. coli*; Lane 3, *VP1* callus PCR product (660 bp); Lane 4, *VP1* PCR product in *E. coli*.

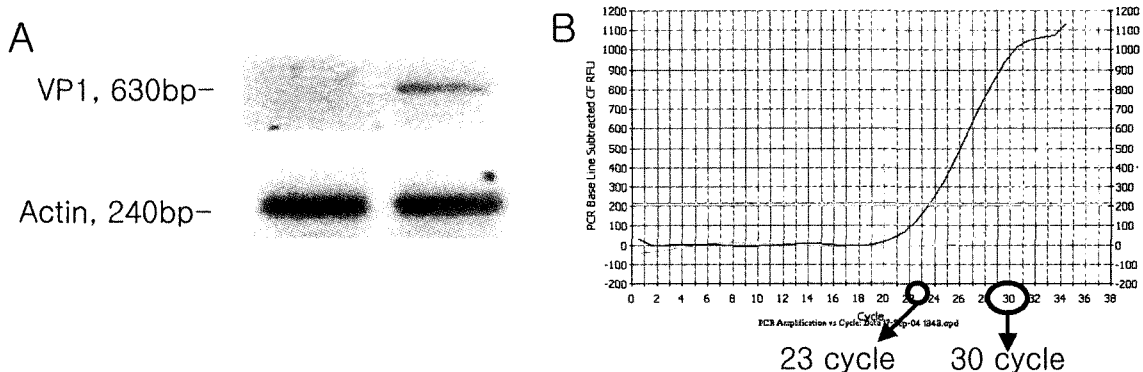
배 SR1 품종에 감염시켰다. 감염시킨 leaf disk에서 hygromycin 내성 (5 mg/L)의 callus들을 선별하였으며, 각각 재분화된 clone으로써 고유번호를 부여하고, 각 clone 중 일부의 잎을 수거하여 genomic DNA를 추출하였다. 형질전환 담배의 genomic DNA내에 삽입된 VP1 또는 GFP 유전자를 확인하기 위하여 GFP와 VP1 각기 특이적 primer를 사용하여 PCR 분석을 수행하였다. 형질전환 하지 않은 식물체 (*Nicotiana tabacum* SR1)의 genomic DNA에서는 해당 DNA의 증폭이 일어나지 않았고, 형질전환된 식물체에서는 각각 660 bp (VP1) 및 738 bp (GFP)의 DNA의 증폭이 관찰되었으며, 이를 통하여 식물체의 염색체 내에 VP1 또는 GFP의 유전자가 도입되었다는 사실을 확인할 수 있었다 (Figure 5).

형질전환 식물체에서 VP1, GFP 유전자의 발현

담배의 염색체 내에 도입이 확인된 GFP와 VP1 유전자가 식물체 내에서 정상적으로 발현되는지의 여부를 확인하기 위하여, GFP 형질전환체에 대하여는 형광현미경에 의한 조직의 검색 (Olympus fluorescence Microscope BX-50, DP-70 Fluorescence detector system), 그리고 VP1 및 GFP 형질전환체에 대하여 SDS-PAGE 및 ELISA 등을 수행하였다. 먼저 GFP 형질전환체에 대한 형광현미경 검색에서는 녹색 형광을 발하는 조직을 가진 약간의 형질전환체가 발견되었으나, 대조군 (*Nicotiana tabacum* SR1)과 분명한 차이를 보이지는 아니하였으며, 이 형질전환체의 형광이 GFP 단백질에 의한 것인지 아닌지 확인할 수가 없었다. 또한 VP1 및 GFP 형질전환체에 대한 SDS-PAGE에 의한 분석에서도 대조군인 SR1에서는 발견되지 아니한 소수의 minor band

가 확인되었으나, VP1 및 GFP 과발현으로 인정되는 단백질 밴드는 발견할 수 없었다 (자료 미제시). 또한 ELISA의 결과는 대장균에서 생산된 anti-GFP antibody 및 anti-VP1 antibody를 사용하였으나, 이 단백질들의 식물체내에서 대량생산됨을 증명할 만한 수준은 아니라 판단되었다. 그 이유는 callus 또는 소량의 잎 수준의 적은 시료로써 ELISA 실험에 충분한 발현 단백질을 얻지 못함에 있었으며, 또한 항체의 특이도도 대장균에서 생산된 항원을 사용하여 만든 항체가기에 식물체에서 발현된 동일 단백질을 동일한 특이도로 반응하지 못할 수도 있을 것으로 생각되었다 (자료 미제시).

따라서 VP1 및 GFP 유전자의 담배 형질전환체에서 해당 mRNA의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR과 Real-Time RT-PCR을 수행하였다. 동일한 형질전환체에서 추출된 VP1의 cDNA (정상 RT-reaction을 template로 사용)와 chromosomal DNA (reverse transcriptase를 제외한 RT-reaction을 template로 사용)를 각기 사용한 RT-PCR의 결과에서, 전자의 경우 660 bp의 PCR product (VP1)가 생성되었으나 후자의 경우 형성되지 않았다. 이는 VP1의 전사체가 형질전환체에 존재함을 보여주는 것으로 판단하였다 (Figure 6A). 그러나 RT-reaction에서 reverse transcriptase를 첨가하지 아니한 반응액에서도 이를 다량 template로 사용한 PCR의 경우, 극히 미량의 660 bp PCR product (VP1)의 생성을 볼 수 있었으며, 이는 PCR 반응액 중 형질전환체의 chromosome이 template로 작용한 것으로 판단되었다. 이는 본 연구의 total RNA isolation과정에서 동량의 isopropanol을 사용하여 RNA를 침전시켰기에 chromosomal DNA가 제거되지 못하였음을 보여주는 것이며 또한 RNase free DNase를 사용하지 아니한 것도 원인이라 생각되었다. 그러나 cDNA



**Figure 6.** RT-PCR and Real-Time RT-PCR analysis of VP1 in transgenic *Nicotiana tabacum*. In order to evaluate the expression of mRNA (VP1), RT-PCR and Real-Time RT-PCR were performed using total RNA from transgenic strain VP1-4. A. RT-PCR analysis; Positive control was used Actin gene (240 bp) in *Nicotiana tabacum* VP1-4 (low panel). The 660 bp RT-PCR product was shown using cDNA as template in right lane and was not shown using chromosomal DNA in left lane (upper panel). B. Real-Time PCR analysis; Time course of detected SYBR Green-associated fluorescence during real-time RT-PCR analysis of VP1 expression. The threshold is set at ten standard deviations above the background level from cycles 3-12. The threshold cycle (C<sub>T</sub>) is determined by interpolation of the time course at the threshold fluorescence level. C<sub>T</sub> using cDNA from transgenic strain VP1-4 was estimated to 23 cycles and C<sub>T</sub> using chromosomal DNA from same strain was 30 cycles. It means that the copy number of VP1 cDNA from VP1-4 was increased approximately 2<sup>7</sup> fold than chromosomal DNA from same strain after reverse transcription (see text in detail).

template를 희석하여 PCR을 수행하고 비교하여본 결과, cDNA의 *VPI* copy수는 동량의 chromosome의 그것과 최소 1000배 이상의 차이를 보였기에 *VPI*이 형질전환된 담배 내에서 *VPI*의 전사체가 생성되었음은 인정할 수 있었다.

또한 *VPI* 전사체의 정량을 위해 RT-PCR의 결과에서 발현이 인정된 다수의 형질전환체에 대한 Real-Time RT-PCR을 수행하였다. 동일한 형질전환체에서 추출된 *VPI*의 cDNA (정상 RT-reaction을 template로 사용)와 chromosomal DNA (reverse transcriptase를 제외한 RT-reaction을 template로 사용)를 각기 사용한 Real-Time PCR에서 전자와 후자의  $C_T$  (Threshold cycle) value의 차이 ( $C_{T1}-C_{T2}$ )가 7 cycle이 되는 형질전환체 (*VPI-4*)를 발견할 수 있었으며, 이는 PCR의 초기 template에서  $2^7$ 의 copy 수의 차이를 나타내는 것이다 (Figure 6B). 실험에 사용된 전사체가 있음이 인정된 8 개의 형질전환체 중 1개가 1 cycle, 6개가 3 cycle, 1개가 7 cycle의  $C_T$  value의 차이를 보이는 것으로 나타났으며, 이는 형질전환체간 *VPI* mRNA 발현양이 상당한 차이가 있음으로 해석하였다. 선별된 형질전환체 *VPI-4*는 반복실험에서도 같은 결과를 보였으며, RNase free DNase를 사용한 RT-reaction에서도 동일한  $C_T$  value를 보여 주었다. 이 *VPI-4*는 현재 계통을 확립시키기 위하여 성장 중이며 향후 *VPI* 단백질의 식물체에 의한 대량생산에서 생산효율의 향상을 위한 주요 실험재료가 될 것으로 기대하고 있다.

## 적 요

FMDV는 동물에서 구제역을 일으키는 병원체이며, *VPI*은 이 바이러스의 주요 capsid 단백질이므로 구제역의 진단과 단백질 백신의 개발에 가장 많이 사용되는 재료 중 하나이다. 본 연구는 FMDV taiwan O형과 베트남에서 분리된 FMDV의 *VPI* sequence를 기반으로 식물에서 *VPI* 유전자의 발현을 위하여 633 bp의 *VPI* 유전자로 재편집하였으며, 이를 long-nucleotide를 사용한 multiple fragment extension 방법을 사용하여 인공적인 DNA 단편을 합성하였다. 또한 새로운 식물 형질전환 벡터로 pBI121 과 pCAMBIA1390의 장점을 수용하여, hygromycin 저항성과 CaMV 35S promotor를 포함하는 pCAMBIA II를 제작하였다. 제작된 벡터와 *VPI* 유전자 및 *GFP* 유전자를 사용하여 담배를 형질전환시켰고, 각각의 형질전환 식물체내에서 전체길이의 target gene (*VPI*)의 성공적인 삽입을 확인하였다. 각 유전자의 발현은 RT-PCR과 Real-Time PCR의 결과로 측정하였으며, *VPI* 유전자의 전사가 담배 내에서 이루어졌음과 고효율의 전사체를 만드는 형질전환체 *VPI-4*를 선별하였다.

## 사 사

본 연구는 바이오그린21사업 (과제번호- 1000520030097000)의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

## 인용문헌

- Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJ (2003) The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* 129: 1-36
- Chen N, Hsiang T, Goodwin PH (2003) Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. *J Microbiol Meth* 53: 113-122
- Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H (2001) The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco. *Plant Cell Rep* 20: 60-66
- Feng Q, Chen X, Ma O, Liu Y, Ding M, Collins RA, Ko LS, Xing J, Lau LT, Yu AC, Chen J (2003) Serotype and *VPI* gene sequence of a foot-and-mouth disease virus from Hong Kong (2002). *Biochem Biophys Res Commun* 302: 715-721
- Fisher R, Emans N (2004) An introduction to industrial and pharmaceutical protein production in plants. In: Paul C, Harry K, Handbook of plant biotechnology, Vol. 2, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, pp 741-745
- Gareth D (2002) Foot and mouth disease. *Res Veter Sci* 73: 195-199
- Grubman MJ, Baxt B, Mason PW (2003) Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* 91: 9-32
- Hooykaas PJ (1989) Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol Sep* 13: 327-336
- Ikeda M, Ojima K, Ohira K (1976) The thiamine requirement for callus formation from soybean hypocotyl. *Plant Cell Physiol* 17: 1097-1098
- Murashige T, Skoog T (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Newell CA, I BM, Hibberd JM, Gray JC (2003) Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts transgenic. *Nucleic Acids Res* 12: 631-634
- Ohira K, Ojima K, Fujiwara A (1973) Studies on the medium of rice cell culture. *Plant Cell Physiol* 14: 1113-1121
- Reisen D, N LC, Ozalp C, Chaumont F, Marty F (2003) Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with *GFP* in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Mol Biol* 52: 387-400
- Samuel AR, Knowles NJ (2003) Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 91: 65-80
- Wigdorovitz A, Perez DM, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM, Morris TJ, Borca MV (1999) Protection of mice against



- challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* 10: 85-91
- Wu L, Lubin J, Zhiai Z, Jihua F, Zhang Q, Zhu H, Han Q, Xu Z (2003) Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine* 21: 4390-4398
- Yoon BS (1999) RT-PCR. In: The methods of molecular biology II, Ed, Kyonggi University, Suwon, pp 420-422
- Zatyko JM, Molnar I (1990) Adventitious root formation of chokeberry (*Aroniamelanocarpa Eliot*) influenced by the pH of medium. *Fruit Sci Rep* 17: 21-22

(접수일자 2004년 10월 13일, 수리일자 2004년 12월 13일)